



EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

GENETIKAI TANSZÉK

***A TRA-1/GLI szex-determinációs fehérje
célgénjeinek meghatározása és analízise
Caenorhabditis elegans-ban***

Doktori értekezés tézisei

Készítette:

Tóthné Kutnyánszky Vera

Biológia Doktori Iskola

Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program

A doktori iskola vezetője: **Dr. Erdei Anna** akadémikus

A program vezetője: **Prof. Vellai Tibor**

Témavezető: **Prof. Vellai Tibor** Tanszékvezető egyetemi tanár

Budapest

2020

Bevezetés és célkitűzés

Az állatvilágban az ivaros szaporodás megjelenésével a sikeres párzás érdekében különböző nemek alakultak ki, amelyek jellegzetes anatómiai, fiziológiai és viselkedési különbségeket mutatnak egymástól. A nemek kialakítása az egyes állatfajokban eltérő lehet. Doktori munkám során a fonalféreg *Caenorhabditis elegans* modellorganizmussal dolgoztam, ahol az önmegtermékenyítő XX kariotípusú hermafroditák és a hermafroditák megtermékenyítésére képes XO kariotípusú hímek közötti anatómiai és viselkedési különbségeket az ún. szex-determinációs génkaszkádnak alakítja ki, amelynek terminális transzkripciósfaktora a TRA-1 (Transformer) fehérje (Madl és Herman, 1979; Miller és mtsi., 1988; Rhind és mtsi., 1995; Luz és mtsi., 2003). A TRA-1 a *Drosophila melanogaster* Ci (Cubitus interruptus) és a humán GLI (GLIoma associated) fehérje ortológja. A Ci és a GLI fehérjék a Hedgehog (Hh) jelátviteli útvonal downstream transzkripcionális faktoraiként működnek. A Hh útvonalnak alapvető szabályozó funkciója van az embrionális mintázatképződésben és a szervek morfogenezisében. *C. elegans*-ban azonban a kanonikus Hh útvonal több komponens is hiányzik (Bürglin és Kuwabara, 2006).

A TRA-1 fehérje konzervált kötőszekvenciájának meghatározásával kutatócsoportunk potenciális TRA-1 célgéneket azonosított in silico módszerekkel. Egyik érdekes jelölt a szex-determinációs génkaszkádnak elején funkcionáló *xol-1* (XO lethal) gén volt, ami előre vetítette, hogy a TRA-1-nek szerepe lehet nem csak a szomatikus sejtek nemi identitásának kialakításában, hanem annak stabil fenntartásában is. Egy másik potenciális jelölt a *goa-1* (G-protein, O, subunit) gén volt, amely egy az idegrendszer fejlődésében és működésében résztvevő transzmembrán fehérje alegységet kódol (Lochrie és mtsi., 1991). Noha a TRA-1 szerepe az idegrendszer nemi identitásának kialakításában ismert volt, a tényleges effektor molekulák továbbra is nagyrészt azonosítás tárgyát képezték (Oren-Suissa és mtsi., 2016; Portman, 2017; Serrano-Saiz és mtsi., 2017).

Doktori munkám célja az volt, hogy genetikai eszközökkel (pl. riporter génkonstrukciók létrehozásával és episztázis elemzéssel) bizonyítsam a TRA-1 – *xol-1* és TRA-1 – *goa-1* szabályozási kapcsolatok létét és fiziológiai funkcióit. Az elért eredmények elvezethetnek az idegrendszer működésének és a szomatikus szex-determináció mechanizmusának pontosabb megértéséhez.

Módszerek

In vivo expressziós vizsgálatok

A *goa-1* expressziós elemzésének érdekében transzkripció és transzláció riporter génkonstrukciókat hoztam létre molekuláris módszerek alkalmazásával. A *goa-1* kódoló szekvenciában azonosított konzervált TRA-1 kötőhely funkcionális vizsgálatához *in vitro* mutagenézissel riporter génkonstrukciókat hoztam létre, amelyek elrontott kötőhellyel rendelkeznek. A konstrukciókat az állatokba bioliztikus transzformáció segítségével juttattam be, majd fluoreszcens mikroszkóp segítségével analizáltam a transzgénikus vonalakat

Hím-specifikus viselkedési mintázatok vizsgálata

A párzási viselkedés megfigyelése során fiatal (szűz) felnőtt állatokat használtam. 3 cm átmérőjű táplemezen lévő 1 cm-es baktériumpázsit közepére 5 db *unc-51(-)* mutáns felnőtt hermafrodita egyedeket tettem, majd a baktérium pázsit szélére 1 db hím állatot raktam, aminek mozgását 10 percen keresztül rögzítettem (videó) Zeiss Stereolumar fénymikroszkóp segítségével. A megfigyelés során rögzítettem azt az időt, míg a hím a hermafroditák közelébe érkezett, egy hermafrodita megtalálási idejét, valamint a vulva lokalizálásnak idejét (Loer és Kenyon, 1993).

A párkeresési vizsgálat során 9 cm átmérőjű táplemezeket használtam, a közepén kialakított 1 cm átmérőjű baktériumpázsitra helyeztem a hímekeket (törzsenként 20 db lemez), majd 24 órán keresztül figyeltem, hogy az állatok elhagyták-e a táptalajt. A törzsek összehasonlításához megadtam a P_L (probability of leaving) értéket, amit $P_L = N_t/N_0 = \exp(-P_L t)$ egyenlet alapján számoltam ki (N_t az adott időpillanatban elvándorolt egyedek száma, N_0 a kiindulási egyedek száma (Lipton és mtsi., 2004)).

Izoamil-alkohol (IAA) illatanyagra adott adaptációs válasz megfigyeléséhez 9 cm-es baktérium nélküli táplemezeket használtam. Az álltokat a lemez közepére helyeztem. Tőlük egyenlő távolságra cseppenttem az etanolban feloldott odoránst (IAA) és a kontroll etanolt. A kísérletet 1 óra elteltével értékeltem ki. Az adaptáció során az állatokat 1 órán át tartottam 8 nM IAA illatanyagot tartalmazó M9 oldatban. Kemotaxis indexet $C_i = (N_{IAA} - N_{EtOH})/N_0$ egyenlet alapján számoltam, ahol N az állatok száma az illatanyagokon, ill. kiinduláskor. Adaptációs rátát $[C_i(EtOH) - C_i(IAA)]/C_i(EtOH)$ alapján számoltam ki (Matsuki és mtsi., 2006).

A szex-feromon kemotaxis kísérlet során tárgylemezre öntött 0,3 mm vastag táptalajt használtam. A 20 db szűz állatot a lemez közepére helyeztem, ettől 1,5 cm-re 1 μ l *C. remanei* szex-feromont, ill. 1 μ l *C. elegans* szex-feromont cseppentettem. Az állatok viselkedését fél óra után értékeltem ki. A kemotaxis indexet a fentiek alapján számoltam. A szex-feromon létrehozásához 20 db fiatal szűz állatot inkubáltam 6 órán át M9 oldatban (Chasnov és mtsi., 2007).

Embrionális életképtelenség mérése

Párhuzamosan 5 lemezre felnőtt hermafrodita állatokat (5-10 darab /lemez) tettem, és 1-3 óra hosszat hagytam őket a lemezeken a kísérletnek megfelelő hőmérsékleten. Megszámoltam, hogy ennyi idő alatt mennyi embriót raktak le, majd egy nap múlva a kikelt lárvákat is megszámláltam, illetve 2-3 nap múlva megszámláltam a felnőtt egyedek számát is. Homozigóta állatoknál az embrionális életképtelenséget a következő egyenlet alapján számítottam ki: $P_L = (N_E - N_F) / N_E$, ahol E az embriók száma, F a felnőttek száma. A csak heterozigóta formában fenttartható mutánsoknál a várható Mendeli arányok alapján korrigáltam, $P_L = (N_E / 4 - N_M) / N_E / 4$, ahol a várt mutánsok számához viszonyítottam a felnőtt mutánsok (M) számát.

A doktori értekezés tézisei

A TRA-1 transzkripcionálisan gátolja a goa-1 gént

- Gélretardációs esszével (EMSA) és riporter génkonstrukció segítségével (fluoreszcens mikroszkópia) kimutattam, hogy a TRA-1 képes a *goa-1* génben található konzervált TRA-1 kötőhelyhez szekvencia-specifikusan kapcsolódni, és a TRA-1 befolyásolja a *goa-1* gén expresszióját.
- A *goa-1* gén 5. exonjában azonosított TRA-1 kötőhely szekvenciájában 3 bázist megváltoztatva a TRA-1 kötés nem jön létre.
- A *goa-1* paralóg *gpa-16* gén homológ szekvenciájához a TRA-1 nem tud kötődni, azonban a szekvenciában 3 bázis cseréjével (a TRA-1 kötőhely „helyreállítása”) a kötés kialakul.
- Létrehoztam egy transzlációs fúziós GOA-1::GFP riporter konstrukciót (*eluIs306*), és megállapítottam, hogy a fúziós fehérje a neuronok membránjában lokalizálódik.

- *In vitro* mutagenézissel az *eluls306* konstrukció felhasználásával létrehoztam egy mutáns kötőhellyel rendelkező transzgént is (*eluls307*, mutGOA-1::GFP), amihez a TRA-1 nem tud kötni. Ebben a konstrukcióban 9 bázispár hiányzik a konzervált TRA-1 kötőszekvenciából.
- Összeségében kimutattam, hogy a TRA-1 transzkripcionálisan gátolja a *goa-1*-et az 5. exonban található kötőszekvencián keresztül.

A GOA-1 eltérő expressziót mutat hermafroditákban és hímekben

- Kimutattam, hogy hermafroditákban a GOA-1 kifejeződik az idegsejtekben, a vulva körüli izomban, a spermatékában, és a DTC-kben (a gonád disztális csúcssejtjei), hímekben pedig a farki idegsejtekben, és az azokat a körülvevő izomsejtekben.
- A *pgoa-1::GOA-1::GFP* transzgén magasabb szintű (erősebb) expressziót mutat felnőtt hímekben, mint hermafroditákban. A *pgoa-1::GOA-1::GFP* expressziója *tra-1(-)* mutáns genetikai háttérben szignifikánsan magasabb, mint a vad típusú háttérben, illetve *fem-3(-)* mutáns háttérben (ami megfelel *tra-1* funkciónyeréses genetikai háttérnek) szignifikánsan alacsonyabb, mint a vad háttérben.
- Kimutattam, hogy a *pgoa-1::mutGOA-1::GFP* konstrukciót hordozó felnőtt hermafroditák és hímek között nincs eltérés az expresszióban.
- A GOA-1 akkumulációs szintje lárvális stádiumokban magasabb az XX hermafroditákban, mint az XO hím állatokban. A fehérje akkumulációja szintén magasabb XX hermafroditákban, mint XX kariotípusú *tra-1(-)* mutáns (hím anatómiájú) állatokban.
- Embriókon végzett vizsgálatok alapján hímekben kb. 1,5-ször magasabb a GOA-1 expressziós szintje, mint hermafroditákban. Az erre vonatkozó fluoreszcens mikroszkópos eredményeket RT-PCR-rel (mRNS szintek mérése) is megerősítettem.
- A GOA-1 mennyisége TRA-1-függő ivari dimorfizmust mutat, és a TRA-1 az általunk *in silico* azonosított konzervált kötőhelyen keresztül szabályozza a *goa-1* gén kifejeződését.

A szex-determinációs génkaszkád a goa-1 génen keresztül hat a hím viselkedési mintázokra

- Kimutattam, hogy a *goa-1(-)* mutáns hímek képtelenek a párkeresésre.

- *goa-1(-)* mutáns hímekben hiányzik a párzási ösztön, a szűz hímek nem hagyják el a táplálékot párkeresési szándékkal.
- *goa-1(gf)* funkciónyeréses mutáns hímek és hermafroditák is mutatnak párkeresési hajlandóságot. Hermafroditáknál a táplálékelhagyó viselkedés hímekhez hasonlóan csak felnőtt korban jelenik meg és a peterakás nem szuppresszálja, vagyis a *goa-1* aktivitása az ivarszervektől jövő jelet downstream szabályozza.
- Kimutattam, hogy a *goa-1(-)* mutáns hímek nem képesek szex-feromon érzékelésére, míg a *goa-1(gf)* funkciónyerés mutáns hermafroditák a hímekhez hasonlóan vonzódnak a szex-feromonhoz.
- *goa-1(sa734); tra-1(e1099)* kettősmutáns XX hímek nem képesek a szex-feromon érzékelésére. A *goa-1* tehát downstream hat a *tra-1*-től ennek a funkciónak a szabályozásában.
- Kimutattam, hogy a CEM neuronokra specifikus *ppkd-2::GFP* riporter konstrukció ektopikusan expresszálódik *goa-1(gf)* funkciónyeréses mutáns hermafroditák feji régiójában. Az expresszáló sejtek kiléte egyelőre tisztázatlan maradt. Feltehetően egy-egy CEM neuron GOA-1-függő módon elkerüli az apoptózist, vagy más sejtekben expresszálódik a PKD-2 fehérje.
- Az AWC neuronban a GOA-1 szükséges az IAA adaptációjához. Vad típusú hímeket és hermafroditákat vizsgálva kimutattam, hogy a hímek lassabban adaptálódnak ehhez az odoránshoz, mint a hermafroditák. E mellett *tra-1(e1575gf)* funkciónyeréses mutáns „nőstények” adaptációja szignifikánsan lassabb, mint a vad típusú hermafroditáké.
- Összességében bizonyítottam, hogy a GOA-1 szerepet játszik a hím-specifikus viselkedési mintázatok kialakításában, és a szex-determinációs génkaskád ezen a fehérjén keresztül határozza meg a hím viselkedést.

A goa-1 paralóg gpa-16 gén nem áll TRA-1 szabályozás alatt

- Vizsgálataimban kimutattam, hogy *goa-1(sa734)* genetikai nullmutáns embriók életképtelensége (cc. 35%) teljessé válik *gpa-16(ok2349)* nullmutáns genetikai háttérben (a *gpa-16(-)* egyszeres mutánsok embrió életképtelenségének penetranciája cc. 25%).
- *gpa-16(-); fem-3(-)* kettősmutáns háttérben (a FEM-3 funkció hiánya egy *tra-1* funkciónyeréses mutációnak felel meg) az embriók életképtelensége megemelkedett,

míg a *gpa-16(-); tra-1(-)* kettősmutáns háttérben csökkent a *gpa-16(-)* egyszeres mutáns kontrollhoz képest.

A *xol-1* egy újonnan azonosított TRA-1 célgén

- A *sex-1(-); tra-1(-)* kettősmutáns XX hímek embrionális életképtelensége megfelel az egyszeres mutánsok embrióéletképtelenségének összegével, míg a *sex-1(-); tra-1(gf)* kettős mutánsok életképtelensége a *tra-1(gf)* mutáns életképességével vethető össze, vagyis a *tra-1(gf)* hatása eliminálja *sex-1* mutációból adódó életképtelenséget
- A dóziskompenzációs komplex egyik alkotó fehérjéje a DPY-21. Vizsgálataimban kimutattam, hogy a *dpy-21(-); tra-1(-)* kettős mutánsok életképtelensége összeadódik.
- *tra-1(-)* mutáns XX hímek embrionális életképtelenségét a *xol-1(y9)* nullmutáció szuppresszálja.
- Összességében bizonyítottam, hogy a *xol-1(-)* mutáns XX állatok embrionális letalitását a megemelkedett XOL-1 mennyisége okozza, és a *xol-1* expresszióját a TRA-1 közvetlenül represszálja.

Következtetések

C. elegans-ban a *goa-1* gén kódolja az egyetlen G ortológ fehérjét. A GOA-1 számos viselkedési mintázatban, az idegsejtek migrációjában és az első sejtosztódás szabályozásában vesz részt (Lochrie és mtsi., 1991; Mendel és mtsi., 1995; Miller és Rand, 2000). A sejtosztódás során a GOA-1 redundánsan működik a GPA-16 fehérjével. A *goa-1* exoni szekvenciájában megtalálható egy konzervált TRA-1 kötőhely, míg a paralóg *gpa-16* gén kódoló szekvenciájában nincs ilyen konzervált kötőhely, de a genetikai kód degeneráltságának köszönhetően ezen eltérő szekvenciák azonos aminosavakat határoznak meg. Ez arra enged következtetni, hogy az *in silico* prediktált kötőhely funkcionális. Riporter konstrukció segítségével kimutattam, hogy a TRA-1 fehérje a *goa-1* szekvenciával tud kötést kialakítani, míg a *gpa-16* génben talált szekvenciával nem, vagyis a homológ régió 3 bázisnyi eltérése elegendő ahhoz, hogy a TRA-1 csak az egyik gént tudja szabályozni, ennek biológiai jelentősége azonban még tisztázatlan.

További génexpressziós vizsgálataim alapján arra következtethetünk, hogy a TRA-1 gátolja a *goa-1*-et. A GOA-1 minden életkorban kifejeződik hermafroditákban és hímekben is, de a

szintje minden életkorban a magasabb hímekben, mint a hermafroditákban, ami arra enged következtetni, hogy a szex-determinációs génkaskád a *goa-1*-en keresztül az állatok teljes élettartalma alatt egy folyamatos, finom szabályzást valósít meg.

A TRA-1 – *goa-1* szabályozási kapcsolat biológiai funkciójának feltárása során a GOA-1 viselkedésben betöltött szex-specifikus szerepét vizsgáltam. *goa-1*(-) funkcióvesztéses mutáns hímek nem képesek a hermafroditák megtalálására. Ebből arra következtettem, hogy a hermafroditák által kibocsátott feromont nem képesek érzékelni. Ezt a feltevést támasztja alá az az irodalmi adat, hogy a GOA-1-et összefüggésbe hozták a szex-feromonhoz nagyon hasonló daumon érzékelésével (van Swinderen és mtsi., 2002; Ludewig és Schroder, 2013). Szex-feromonnal végzett kemotaxis kísérletekkel igazoltam ezt a feltevést, sőt vizsgálataim során kimutattam, hogy a GOA-1 overexpressziója hermafroditákban is kiváltja a kemotaxist. Összevetve azokkal az ismeretekkel, hogy a szex-feromon felfogása a CEM neuronokban történik (hermafroditákban apoptózissal elpusztul - (Sulston és mtsi., 1983), és hogy bizonyos esetekben az AWA és AWC sejtek hímekben ezt a képességet át tudják venni (White és mtsi., 2007), arra következtethetünk, hogy GOA-1 szükséges a hím-specifikus képesség kialakulásáért, végső soron a TRA-1 az eltérő identitást részben a *goa-1*-en keresztül valósítja meg.

A felnőtt hímek párzópartner keresése érdekében akár a tápforrást is elhagyják (Lipton és mtsi., 2004). Igazoltam, hogy a GOA-1 nélkülözhetetlen ennek a szexuális ösztönnek a kialakulásában, illetve túltermelése hermafroditákban is kiváltja ezt a viselkedési mintázatot, vagyis a *goa-1* mutációkkal szétkapcsolható a viselkedési mintázat az aktuális kariotípustól. Kimutattam továbbá, hogy az AWC neuron által érzékelt IAA adaptációs rátája eltér a hímekben és hermafroditákban, amiből szintén arra következtethetünk, hogy a *goa-1* szerepet játszik a nemi identitás kialakításában és fenntartásában. Kísérleteinkből arra következtethetünk, hogy a GOA-1 a szex-determinációs génkaskád egyik effektor fehérjéje, amin keresztül megvalósul a hím idegrendszer kialakítása és szabályozása.

Bizonyítottam, hogy a TRA-1 a *xol-1* transzkripcionális gátlásán keresztül a hermafrodita sejtorsót stabilizálja. A szex-determinációs számláló mechanizmus során hermafroditákban a az X- kromoszómákról jövő gátlás a meghatározó Kuwabara (2007), *xol-1* hiányában aktiválódik a dóziskompensációs kaskád. Ennek következtében az X-kromoszómás számláló gének mennyisége is a felére csökken, ami a hímekre jellemző X dózis, és ez lehetővé tenné a *xol-1* bekapcsolását. Ez azt jelenti, hogy hermafroditákban szükséges egy olyan autoszómáról

jövő jel, ami az állat teljes élete során stabilizálja a *xol-1* represszióját XX kariotípusú állatokban. Az elvégzett episztázis analízis alapján arra következtethetünk, hogy a TRA-1 gátolja a *xol-1* expresszióját az egyedfejlődés és a felnőtt élettartam alatt.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Hargitai, B., **Kutnyánszky, V.**, Blauwkamp, T. A., Steták, A., Csankovszki, G., Takács-Vellai, K., & Vellai, T. *xol-1*, the master sex-switch gene in *C. elegans*, is a transcriptional target of the terminal sex-determining factor TRA-1. *Development*, **136**(23): 3881–3887 (2009).
2. **Kutnyánszky, V.**, Hargitai, B., Hotzi, B., Kosztelnik, M., Ortutay, C., Kovács, T., Győry, E., Bördén, K., Princz, A., Tavernarakis, N., & Vellai, T. Sex-specific regulation of neuronal functions in *Caenorhabditis elegans*: the sex-determining protein TRA-1 represses *goa-1/Gα_{i/o}*. *Mol. Genet. Genomics*, **295**(2): 357–371 (2020).

Irodalomjegyzék

- Bürglin, T. R. & Kuwabara, P. E. Homologs of the Hh signalling network in *C. elegans*. pages 1–14 (2006).
- Chasnov, J. R., So, W. K., Chan, C. M. & Chow, K. L. The species, sex, and stage specificity of a *Caenorhabditis* sex pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(16):6730–6735 (2007).
- Kuwabara, P. E. Complex Solution to a Sexual Dilemma. *Developmental Cell*, **13**(1):6–8 (2007).
- Lipton, J., Kleemann, G., Ghosh, R., Lints, R. & Emmons, S. W. Mate searching in *Caenorhabditis elegans*: a genetic model for sex drive in a simple invertebrate. *J Neurosci*, **24**(34):7427–7434 (2004).
- Lochrie, M. A., Mendel, J. E., Sternberg, P. W. & Simon, M. I. Homologous and unique G protein α subunits in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Regul*, **2**(2):135–154 (1991).
- Loer, C. M. & Kenyon, C. J. Serotonin-deficient mutants and male mating behavior in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, **13**(12):5407–5417 (1993).
- Luz, J. G., Hassig, C. A., Pickle, C., Godzik, A., Meyer, B. J. & Wilson, I. A. XOL-1, primary determinant of sexual fate *C. elegans*, is a GHMP kinase family member and a structural prototype for a class of developmental regulators. *Genes & development*, 17:977–990 (2003).
- Madl, J. E. & Herman, R. K. Polyploids and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 93:393–402 (1979).
- Matsuki, M., Kunitomo, H. & Iino, Y. $G_o\alpha$ regulates olfactory adaptation by antagonizing $G_q\alpha$ -DAG signaling in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS*, **103**(4):1112–1117 (2006).

- Mendel, J. E., Korswagen, H. C., Liu, K. S., Hajdu-Cronin, Y. M., Simon, M. I., Plasterk, R. H. & Sternberg, P. W. Participation of the protein Go in multiple aspects of behavior in *C. elegans*. *Science*, **267**(5204):1652–1655 (1995).
- Miller, K. G. & Rand, J. B. A role for RIC-8 (synembryn) and GOA-1 (G(o) α) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **156**(4):1649–1660 (2000).
- Miller, L. M., Plenefisch, J. D., Casson, L. P. & Meyer, B. J. *xol-1*: A gene that controls the male modes of both sex determination and X chromosome dosage compensation in *C. elegans*. *Cell*, **55**(1):167–183 (1988).
- Oren-Suissa, M., Bayer, E. A. & Hobert, O. Sex-specific pruning of neuronal synapses in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **533**(7602):206–211 (2016).
- Portman, D. S. Sexual modulation of sex-shared neurons and circuits in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience Research*, **95**(1-2):527–538 (2017).
- Rhind, N. R., Miller, L. M., Kopczynski, J. B. & Meyer, B. J. *xol-1* Acts as an Early Switch in the *C. elegans* Male/Hermaphrodite Decision. *Cell*, **80**(1):71–82 (1995).
- Serrano-Saiz, E., Oren-Suissa, M., Bayer, E. A. & Hobert, O. Sexually Dimorphic Differentiation of a *C. elegans* Hub Neuron Is Cell Autonomously Controlled by a Conserved Transcription Factor. *Current Biology*, **27**(2):199–209 (2017).
- Sulston, J., Schierenberg, E., White, J. & Thomson, J. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, **100**(1):64–119 (1983).
- White, J. Q., Nicholas, T. J., Gritton, J., Truong, L., Davidson, E. R. & Jorgensen, E. M. The sensory circuitry for sexual attraction in *C. elegans* males. *Current biology*, **17**(21):1847–57 (2007).